（90×210㎜ Size）

〈For Research Use Only〉 Code No. 298-65701 (1,000 Tests)

LabAssay™ Glucose (Mutarotase-GOD method)

For Research Use Only Not for Diagnostic Use

〔Introduction〕

α-D-Glucose and β-D-glucose in solution maintain equilibrium in a constant ratio. Glucose oxidase reacts only with β-D-glucose and does not react with α-D-Glucose. Therefore, α-D-Glucose is converted into β-D-glucose using mutarotase.
LabAssay™ Glucose is the reagent kit for assay of glucose based on an enzymatic method with a combination of mutarotase and glucose oxidase. The kit is used for the quantitative determination of glucose in mouse serum, plasma or urine. It is a simultaneous multi-sample assay format using a microplate, but measurements can also be made using a test tube.

〔Kit contents〕

(1)	Buffer Phosphate buffer, pH 7.1 60mmol/L Phenol 5.3mmol/L	150mL	2vials
(2)	Chromogen Reagent After reconstitution Mutarotase 0.13units/mL Glucose oxidase (GOD) 9.0units/mL Peroxidase (POD) 0.65units/mL 4-Aminoantipyrine 0.50mmol/mL Ascorbate oxidase (AOD) 2.7units/mL	For 150mL	2vials
(3)	Glucose Standard I (200mg/dL Glucose)	10mL	1vial
(4)	Glucose Standard II (500mg/dL Glucose)	10mL	1vial

〔Materials and apparatuses to be prepared〕

- 96wells microplate (transparent type)
- Micropipette
- Incubator maintaining at 37℃*
- Plate mixer*
- Microplate reader with 505nm wavelength filter
  (＊ if the microplate reader is not equipped.)

(For test tube method)

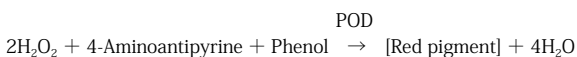
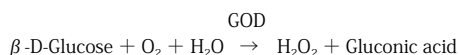
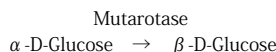
- Test tube
- Pipette
- Incubator maintaining at 37℃
- Spectrophotometer or colorimeter with 505 nm wavelength filter

〔Assay principle〕

When a sample is mixed with the Choromogen Reagent, the α-form of glucose in the sample is converted to β-form by mutarotase. β-D-Glucose is oxidized and yields hydrogen peroxide by glucose oxidase (GOD). In the presence of peroxidase (POD), the formed hydrogen peroxide yields a red pigment by quantitative oxidation condensation with phenol and 4-aminoantipyrine. The glucose concentration is obtained by measuring absorbance of the red pigment.

$$\alpha\text{-D-Glucose} \xrightarrow{\text{Mutarotase}} \beta\text{-D-Glucose}$$

$$\beta\text{-D-Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{GOD}} H_2O_2 + \text{Gluconic acid}$$

$$2H_2O_2 + \text{4-Aminoantipyrine} + \text{Phenol} \xrightarrow{\text{POD}} [\text{Red pigment}] + 4H_2O$$

〔Preparation of reagents to be used〕

① Chromogen reagent :
Dissolve 1 vial of Chromogen Reagent with 150mL of Buffer. After reconstitution, the solution should be stored at 2-10℃ and used within 1 month.

② Standard solution (Microplate method)
Standard solution is prepared by dilution of the provided Standard.

No.	Glucose Standard I	Glucose Standard II	Distilled or deionized water	Sample volume	Concentration
1	50 μL	—	150 μL	2 μL	50mg/dL
2	100 μL	—	100 μL	2 μL	100mg/dL
3	undiluted	—	—	2 μL	200mg/dL
4	—	150 μL	100 μL	2 μL	300mg/dL
5	—	200 μL	50 μL	2 μL	400mg/dL
6	—	undiluted	—	2 μL	500mg/dL

〔Procedure〕

(1) Assay in a microplate
Perform the assay in the wells according to the following table scheme.

	Test	Standard	Blank
Chromogen reagent	300 μL	300 μL	300 μL
Sample	2 μL	2 μL	— *1
	Mix well and incubate at 37℃ for 5 min. Measure the absorbance at 505nm*2 of the test sample and standard solution with the blank solution as the control.		

＊1 The addition of water is omitted because the absorbance difference in the presence of the addition of 2 μL of water does not exhibit any practical use.
＊2 Use 505 nm (Main) and 600 nm (Sub) for two wavelengths.

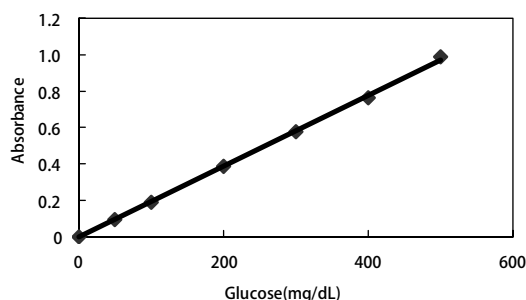
(2) Assay in a test tube

Perform the assay in a test tube according to the following table scheme.

	Test	Standard	Blank
Chromogen reagent	3.0mL	3.0mL	3.0mL
Sample	20 μL	20 μL	— *1
	Mix well and incubate at 37℃ for 5 min. Measure the absorbance of the test sample and standard solution with the blank solution as the control. Colorimeter with 505 nm Spectrophotometer : 505 nm*2		

*1 The addition of water is omitted because the absorbance difference in the presence of the addition of 20 μL of water does not exhibit any practical use.

*2 Use 505 nm (Main) and 600 nm (Sub) for two wavelengths.

〔Standard curve〕〔assay in a microplate〕

Microplate reader : SAFIRE (TECAN)

〔Performance〕

(1) Sensitivity〔assay in a test tube〕

- The absorbance is below 0.03, when measuring purified water as a sample.
- The absorbance is 0.40 to 0.55, when measuring 200 mg/dL glucose as a sample.

(2) Specificity

The glucose concentration is less than ± 12%, when measuring the known concentration of a control serum or a urine as a sample.

〔Usage Notes〕

(1) Sample

- Samples should be used immediately after collecting.
- The glucose in whole blood decreases due to glycolysis in erythrocytes when a sample is kept after collecting blood. Therefore, separation of blood cells should be done as quickly as possible.
- Ascorbic acid and bilirubin cause a slightly negative effect on the assay.
- Hemolysis gives a slightly positive effect on the assay.
- Anticoagulants such as heparin, citrate, oxalate and EDTA and sodium fluoride as a glycolytic inhibitor, should not affect the assay when they are used in their usual amounts.

(2) Notes on the assay

- Do not use the reagents described above in any procedures other than those described herein. Performance cannot be guaranteed if the reagents are used in other procedures or for other purposes.
- Operate the measurement apparatuses according to operator's manuals under appropriate conditions. Consult the apparatus manufacturer for details.
- Keep the provided reagents under the indicated conditions before the expiration.
- Do not use reagents, which were frozen in error. Such reagents may give false results.
- After opening the reagents, it is recommended to use them immediately. The opened vials should be capped and kept under the specified conditions.
- Do not use the containers and other materials in the package for any purposes other than those described herein.
- Do not use the reagents at other reaction temperatures and reaction times than descrived herein.
- The reaction completes in about 4 min at 37℃ . When the incubation is continued, the absorbance gradually decreases. Therefore, the incubation should be done within 20 min.
- Glucose can be also measured by a reaction at room temperature (15℃ or more) for 15 min.
- Color level of the reaction solution should show very little change within 1 hour at room temperature.
- This kit is for research use only. Not for diagnostic use.

(3) Safety precausions

- If a reagent comes into contact with the mouth, eyes, or skin, immediately wash with a lot of water. Consult a physician if necessary.
- A pipette with a safety pipette filler should be used.
- Be careful not to cut yourself with the aluminum cap when removing it from the vial.

(4) Waste

- The waste should be processed appropriately according to regulations.
  Buffer contains 500 mg/L phenol.
- All the devices including reagents and vials that come into contact with specimens should be considered potentially infectious.

Expiration date : 18 months after the manufacture

Storage : Store at 2 ～ 10℃

Package : 1,000 tests

〔Reference〕

Miwa, I., Okuda, J., Maeda, K. and Okuda, G. : *Clin. Chim. Acta*., **37**, 538 (1972).

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : ＋81-6-6203-3741
Facsimile : ＋81-6-6201-5964
http://www.wako-chem.co.jp

Wako Chemicals USA, Inc.
1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : ＋1-804-271-7677
Facsimile : ＋1-804-271-7791
http://www.wakousa.com

Wako Chemicals GmbH
Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : ＋49-2131-311-0
Facsimile : ＋49-2131-311100
http://www.wako-chemicals.de

研究用試薬　　コード No. 298-65701 (1,000 回用)

ラボアッセイ ™ グルコース
（ムタロターゼ・GOD 法）

試験研究用試薬であり体外診断用に用いることはできません

〔はじめに〕
溶液中では一定の比率でα-D- グルコースとβ-D- グルコースとが存在しています。本品はα-D- グルコースをβ型に転移させるムタロターゼと、β-D- グルコースのみに作用するグルコースオキシダーゼを組み合わせた酵素法試薬です。マイクロプレート法によりマウス血清中のグルコースの測定に用いることができます。用手法での測定も可能であり、また、ヒト血清中のグルコース定量も行うこともできますが、体外診断用に用いることはできません。

〔キット内容〕

⑴	緩衝液 りん酸緩衝液　60mmol/L, pH7.1 フェノール　5.3mmol/L	150mL	2 本
⑵	発色剤 溶解時 ムタロターゼ　0.13units/mL グルコースオキシダーゼ（GOD）　9.0units/mL ペルオキシダーゼ（POD）0.65units/mL 4- アミノアンチピリン　0.50mmol/L アスコルビン酸オキシダーゼ（AOD）　2.7units/mL	150mL 用	2 本
⑶	ブドウ糖標準液Ⅰ （ブドウ糖　200mg/dL）	10mL	1 本
⑷	ブドウ糖標準液Ⅱ （ブドウ糖　500mg/dL）	10mL	1 本

〔キット以外に必要な器具・器材〕
・96 ウエルの透明マイクロプレート
・マイクロピペット
・恒温槽（37℃）*
・プレートミキサー *
・マイクロプレートリーダー（505nm 吸光フィルター）
（＊：マイクロプレートリーダーの機種によっては不要です）

（用手法の場合）
・試験管
・ピペット（試料採取用、試液分注用）
・恒温槽（37℃）
・分光光度計または 505nm のフィルターをもつ比色計

〔測定原理〕
検体に発色試薬を作用させると検体中のα型グルコースはムタロターゼの

作用によりβ型へ速やかに変換されます。β-D-グルコースはグルコースオキシダーゼ（GOD）の作用を受けて酸化されると同時に過酸化水素を生成します。生成した過酸化水素は、共存するペルオキシダーゼ（POD）の作用により発色試薬中のフェノールと4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、赤色の色素を生成させます。この赤色色素を測定することにより検体中のグルコース濃度を求めます。

ムタロターゼ
α-D-グルコース → β-D-グルコース

GOD
β-D-グルコース＋ O_2 ＋ H_2O → H_2O_2 ＋グルコン酸

POD
$2H_2O_2$ ＋ 4-アミノアンチピリン＋フェノール → ［赤色色素］＋ $4H_2O$

〔試薬の調製法〕

① 発色試薬：発色剤（150mL用）1本を緩衝液（150mL）1本で溶解し、発色試薬として下さい。

② 標準液調製法（マイクロプレート法）
付属のブドウ糖標準液Ⅰ及びブドウ糖標準液Ⅱをそのまま、または希釈して標準液No.1～6とします。

No.	ブドウ糖標準液Ⅰ	ブドウ糖標準液Ⅱ	蒸留水またはイオン交換水	試料採取量	濃　度
1	50 μL	－	150 μL	2 μL	50mg/dL
2	100 μL	－	100 μL	2 μL	100mg/dL
3	原　液	－	－	2 μL	200mg/dL
4	－	150 μL	100 μL	2 μL	300mg/dL
5	－	200 μL	50 μL	2 μL	400mg/dL
6	－	原　液	－	2 μL	500mg/dL

〔標準操作法〕

⑴ マイクロプレート法
下記に従って、ウエル内で反応させてください。

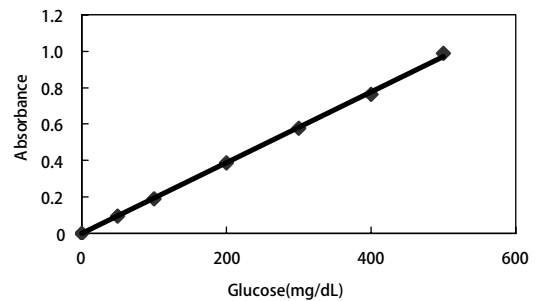
	テスト	スタンダード	ブランク
発色試薬	300 μL	300 μL	300 μL
試　料	2 μL	2 μL	－*1
	よく混合し、37℃で5分間加温。 ブランクを対照として505nm*2における検体及び標準液の吸光度を測定する。		

＊1 水2 μL添加の有無による吸光度の差は実際上ありませんので水の添加は省略しました。
＊2 2波長測定の場合、主波長505nm／副波長600nm。

⑵ 用手法
下記に従って、試験管中で反応させて下さい。

	テスト	スタンダード	ブランク
発色試薬	3mL	3mL	3mL
試　料	20 μL	20 μL	－*1
	よく混合し、37℃で5分間加温。 ブランクを対照として検体及び標準液の吸光度を測定する。 比色計：505nmのフィルター 分光光度計：505nm*2		

注：用手法で測定した場合、100回用となります。
＊1 水20 μL添加の有無による吸光度の差は実際上ありませんので水の添加は省略しました。
＊2 2波長測定の場合、主波長505nm／副波長600nm。

〔標準曲線〕〔マイクロプレート法〕

マイクロプレートリーダー：SAFIRE（TECAN）

〔性　　能〕

⑴ 感度〔用手法〕
・精製水を試料として測定した場合の吸光度は、0.03以下です。
・特定濃度の標準液（ブドウ糖200mg/dL）を試料として測定した場合の吸光度は、0.40～0.55です。

⑵ 特異性
・既知濃度の管理用血清及び尿を測定するとき、既知濃度の±12％以内にあります。

〔使用上の注意〕

⑴ 検体
・採取後の検体は速やかに測定して下さい。
・全血をそのまま放置すると赤血球の解糖作用により血糖値が低下しますので、採血後は速やかに血球を分離して下さい。
・アルコルビン酸とピリルビンはわずかに負誤差を与えます。
・溶血はわずかに正誤差を与えます。
・抗凝固剤のヘパリン、くえん酸塩、しゅう酸塩、EDTA及び解糖防止剤のふっ化ナトリウムは、通常使用量では測定値に影響を与えません。

⑵ 測定上の注意
・この説明書に記載された使用方法に従って使用して下さい。記載された使用方法以外での使用については、測定値の信頼性を保証しかねます。

・測定機器は取扱説明書に従い、適切な条件下で使用して下さい。なお、詳細については、機器メーカーに問い合わせて下さい。
・試薬は指定された条件で使用し、使用期限を過ぎたものは使用しないで下さい。
・誤って凍結させた試薬は使用しないで下さい。正しい結果が得られないことがあります。
・試薬の開封後はなるべく早く使用し、保存する場合は蓋を閉めて指定の条件で保存して下さい。
・本品中の容器、付属品は他の目的に転用しないで下さい。
・指定された反応温度、反応時間以外での使用は避けて下さい。
・反応は約 4 分で終了します。37℃で長時間加温を続けると退色してきますので、20 分以上加温しないで下さい。
・室内温度（15℃以上）、15 分間反応でも測定できます。
・呈色は室内温度で 1 時間以内はほとんど変化ありません。
・本品は体外診断用には使用できません。

⑶　危険防止に関する注意
・試薬が誤って口や目に入ったり、皮膚に付着した場合には、直ちに大量の水で洗い流し、必要があれば医師の手当てなどを受けて下さい。
・ピペット使用の際は直接口で吸わないよう、必ず安全ピペッターなどを使用して下さい。
・バイアル瓶の開栓はアルミキャップ部分で怪我をしないよう慎重に行って下さい。

⑷　廃棄に関する注意
・廃棄に際しては、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（廃棄物処理法）及び排水基準に従って適切に処理して下さい。
本品は緩衝液中にフェノールを 500mg/L 含有しています。
・検体と接触した試薬及び試薬容器などは、感染の危険性があるものとして処理して下さい。

使用期限：製造後　18 ヶ月

貯　　法：２～ 10℃

包　　装：1,000 回用

〔参考文献〕

Miwa, I., Okuda, J., Maeda, K. and Okuda, G. : *Clin. Chim. Acta*., **37**, 538 (1972).

製造発売元
和光純薬工業株式会社
大阪市中央区道修町３－１－２
電話（06）6203－3741（代表）

0708K02